

Pregledni rad
Review

Medicina 2004;42(40):256-264
UDK: 618.39-021.3:575.113.1

GENETIČKI ČIMBENICI U ETIOLOGIJI UČESTALIH SPONTANIH POBAČAJA

GENETIC FACTORS IN ETIOLOGY OF RECURRENT SPONTANEOUS ABORTION

Saša Ostojić¹, Borut Peterlin²

SAŽETAK

Brojna istraživanja mehanizama trudnoće nisu dala jasne smjernice koje bi pomogle praktičarima kao dijagnostičko ili terapijsko sredstvo u rješavanju problema učestalih spontanijih pobačaja nepoznate etiologije. Učestali spontani pobačaji tri su ili više uzastopnih spontanijih prekida trudnoće s istim partnerom prije 23. tjedna gestacije. Značajan su klinički problem budući da se javljaju u 0,5–3% žena i da je njihov uzrok nepoznat u oko 40–50% slučajeva. Poznati uzroci učestalih spontanijih pobačaja raznorodni su i uključuju negenetičke i genetičke čimbenike. Iako je njihov veći dio uzrokovan genetički, genskim ili kromosomskim abnormalnostima, pokušaj liječenja zasad je moguć jedino u skupini negenetičkih uzroka. Cilj je ovog rada prikazati sadašnje spoznaje o genetičkim razlozima učestalih spontanijih pobačaja, o čemu se vrlo malo zna. Upozorit ćemo na HLA-podudarnost u roditelja, monogenske nasljedne bolesti i na gensku varijabilnost u obliku genskih polimorfizama, kao na moguće čimbenike predispozicije za učestale spontane pobačaje. Opisat ćemo čimbenike koji su ušli u kliničku praksu, kao i nove čimbenike, dobivene asocijacijskim studijama poput gena povezanih s imunostim sustavom, koagulacijom i vaskularizacijom. Naposljetku, naš doprinos sustavnom istraživanju uloge genskih čimbenika u etiologiji učestalih spontanijih pobačaja razvijat ćemo kroz projekt HuMGeN (Human Miscarriage Genetic Network) koji smo pokrenuli na međunarodnoj razini.

KLJUČNE RIJEČI: učestali spontani pobačaji, imunogenetika, kromosomske abnormalnosti, HLA-podudarnost, monogenske bolesti, polimorfizmi gena

ABSTRACT

Despite much research into the mechanism of pregnancy and pregnancy loss, few diagnostic or therapeutic procedures for the evaluation of recurrent spontaneous abortion (RSA) can be offered. RSA is generally defined as three or more consecutive spontaneous terminations of pregnancy (with the same biological partner) occurring prior to the 23rd gestational week. RSA presents an important clinical challenge as it occurs in 0.5% to 3% of all pregnancies, and in 40% to 50% of these cases, without any known cause. The known causes of spontaneous pregnancy loss vary, including those of both non-genetic and genetic etiology. The goal of this work is to discuss the current knowledge of genetic causes of RSA, which is a rapidly developing field. The mechanism of HLA incompatibility, monogenetic disease, as well as genetic variance in genetic polymorphisms, as possible factors in causing a predisposition to RSA will be presented. The contributing factors to RSA that are already known in the present clinical practice as well as the more recent suspected factors which have been demonstrated in associated studies, such as genetic variation in genes associated with the immune system, coagulation and vascularization, will also be discussed. In conclusion, our contribution to the systematic research of genetic factors contributing to RSA through the international "HuMGeN" (Human Miscarriage Genetic Network) project will be presented.

KEY WORDS: recurrent spontaneous abortion, immunogenetics, chromosomal aberrations, HLA-sharing, monogenic disorders, gene polymorphism

Točan broj abnormalnih zigota u čovjeka nije poznat jer one propadaju rano u trudnoći, prije no što se ustanovi

da je žena trudna. Ipak, smatra se da se od ukupnog broja oplodjenih jajnih stanica rađa samo 10–25% djece, što navodi na zaključak da je fenomen trudnoće u čovjeka neuspješniji nego što se uobičajeno misli. Moguće je da su spontani pobačaji, pojedinačni ili učestali, evolucijsko sredstvo uklanjanja nenormalnih embrija, čime se smanjuje učestalost rađanja djece s prirođenim malformacijama.

Učestali spontani pobačaji, tri ili više uzastopnih spontanijih prekida trudnoće s istim partnerom prije 23. tjedna gestacije, javljaju se u 0,5–3% žena.^{1,2} Ta se

Ustanova: ¹Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,

²Služba za medicinsku genetiku, Klinika za ginekologiju, Klinički centar Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Prispjelo: 15. 3. 2004.

Prihvaćeno: 31. 3. 2004.

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Saša Ostojić, dr. med., Medicinski fakultet u Rijeci, Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Braće Branchetta 22, 51000 Rijeka. e-mail:sasa@medri.hr

klinička slika dalje klasificira kao primarna, ako uopće nema živorođene djece, ili kao sekundarna, ako uz tri ili više spontanih pobačaja postoje i uspješne trudnoće.³

Prema razdoblju prekida trudnoće, prenatalna se smrt ploda dijeli na pretkliničku (do 6. tjedna gestacije), gubitak embrija (od 6. do 10. tjedna gestacije) i gubitak fetusa (od 10. do 20. tjedna gestacije).¹ Neželjeni se prekidi trudnoće mogu podijeliti na one kod kojih je razlog rana smrt ploda zbog patološkog razvoja i one kod kojih je došlo do anembrijske trudnoće (od engl. anembryonic pregnancies), kada se razvijaju samo embrionalne ovojnice bez ploda.

Iako su, s obzirom na incidenciju, učestali spontani pobačaji značajan klinički problem, danas se mogu pronaći uzroci u 50–60% slučajeva. Njihov veći dio uzrokovan je genetički, genskim ili kromosomskim abnormalnostima,⁴ no pokušaj liječenja zasad je moguć jedino u skupini negenetičke etiologije, uključujući ispravljanje anatomskih nepravilnosti reproduktivnog sustava, liječenje općih bolesti, suzbijanje infekcija, reguliranje hormonskih poremećaja i imunosnu terapiju.

Cilj je ovoga preglednog rada prikaz sadašnjih spoznaja genetičkih razloga učestalih spontanih pobačaja.

ETIOLOGIJA UČESTALIH SPONTANIH POBAČAJA

Uzroci učestalih spontanih pobačaja raznorodni su i brojni, uključujući negenetičke i genetičke čimbenike.^{1,5}

Negenetički uzroci obuhvaćaju opće bolesti, infekcije,⁶ anatomske anomalije reproduktivnog sustava, slabosti vrata maternice, imunosne poremećaje (uključujući povišenu CD56⁺16⁺ aktivnost stanica NK u krvi i endometriju, antifosfolipidna protutijela te autoimune bolesti),^{7,8} endokrine poremećaje (uključujući polistične jajnike, disfunkciju žutog tijela, hiperprolaktinemiju, dijabetes, bolesti štitnjače itd.),^{9–11} hemostatske i metaboličke abnormalnosti (uključujući deficijenciju proteina S, hiperhomocisteinemiju i antikardiolipinska protutijela),^{12,13} hemodinamske poremećaje, tumore,¹ utjecaj okolišnih čimbenika, neke lijekove te psihički stres.

Dob majke je, isto tako, značajan čimbenik rizika za spontane pobačaje. Tako u žena u dobi od 22 do 24 godine iznosi 8,9%, u žena od 42 godine više od 50%, a u žena starijih od 45 godina čak 74,7%.¹⁴ S godinama majke, raste i rizik za sustavne bolesti, uključujući endokrine bolesti i poremećaje metabolizma, što može utjecati na spontani prekid trudnoće, iako se smatra da je u žena starije reproduktivne dobi jedan od vodećih uzroka učestalih pobačaja genetičke prirode.

Od genetičkih uzroka učestalih spontanih pobačaja, najzajčajnije su kromosomske abnormalnosti.¹⁵ Uz strukturne i brojčane abnormalnosti čija je povezanost s učestalim spontanim pobačajima poznata, malo se zna o varijabilnosti i mutacijama gena uključenih u fiziološke

processe tijekom gametogeneze i trudnoće, kao i ulozi multifaktorijskih čimbenika. Spontani pobačaj češći je u žena koje su već imale spontani pobačaj, a učestalost raste s njihovim brojem,¹⁶ što je u skladu s genskim mehanizmom kao objašnjenjem.

U radu ćemo opisati poznate genetičke čimbenike, kako kromosomske tako i genske, koji pridonose etiologiji učestalih spontanih pobačaja. Prije osvrta na genetičku uzročnost, uputit ćemo na dio spoznaja u jednom od najistraživanijih područja genetike trudnoće – imunogenetici.

IMUNOGENETIKA TRUDNOĆE

Tijekom normalne trudnoće embrij, koji je antigeno barem djelomično nepoznat majci, preživi, raste i razvija se, iako se tkivno nepodudarni transplantirani aloantigeni uobičajeno odbacuju imunosnim odgovorom domaćina. Djelomično je ta proturječnost rezultat odnosa na fetoplacentnoj površini, gdje imunokompetentne stanice majčine decidue dolaze u neposredan dodir s HLA (od engl. Human Leukocyte Antigen) – antigenima očeva podrijetla izraženim na stanicama trofoblasta, fetalnom dijelu fetoplacentne površine. Navedeno rezultira stvaranjem hormona, citokina i drugih čimbenika koji, pojedinačno ili međudjelovanjem, reguliraju funkciju stanica na mjestu sučeljavanja majke i ploda. Posebice je to važno tijekom implantacije, kad je kontrola vaskularizacije jedan od ključnih mehanizama održanja trudnoće.¹⁷

HLA-antigeni i učestali spontani pobačaj

Geni HLA-regije kontroliraju strukturu mnogih važnih površinskih staničnih antigena, utječu na rast i razvoj te na raznolikost važnih bioloških funkcija uključenih u imunosne odgovore, a povezani su s više od 40 bolesti u čovjeka, uključujući tumore.^{18–19}

Stanice trofoblasta jedina su vrsta stanica podrijetlom od embrija izloženih decidui i krvi majke, te stoga čine zaštitnu barijeru od majčinih izvršnih stanica. Glavni zaštitni mehanizmi uključuju regulaciju ekspresije neklasičnih HLA-molekula razreda I na stanicama trofoblasta i nespecifično prepoznavanje putem gama-delta limfocita T. U čovjeka stanice ekstraviloznog citotrofoblasta, koje vrše invaziju na majčinu deciduu i spiralne arterije tijekom trudnoće, ne izražavaju “klasične” HLA-A i HLA-B antigene klase I i “klasične” HLA-DP, HLA-DQ i HLA-DR antigene klase II, kao ni organ specifične i embrionalne (onkofetalne) antigene, već jedinstveno izražavaju neklasične HLA-antigene klase I – HLA-G, HLA-E, kao i “klasične” HLA-C antigene ograničene polimorfije.^{20–24} Ovaj obrazac ekspresije jedinstven je među HLA-genima i upućuje na mogućnost da je HLA-G upleten u ključne interakcije za

uspostavljanje i/ili održavanje trudnoće. Stoga su važna i istraživanja varijacija HLA-G gena, što je opisano u poglavlju o polimorfizmima gena kao čimbenicima predispozicije za učestale spontane pobačaje.

Poznata je i povezanost podudarnih HLA-antigena (od engl. HLA-sharing) u partnera i raznih poremećaja reprodukcije, uključujući učestale spontane pobačaje.²⁵⁻²⁶ U približno 50% istraživanja u kojima je pronađena povezanost, upozoreno je na različite podudarne HLA-genske lokuse u roditelja s učestalim spontanim pobačajima.

Podudarnost HLA-antigena nije sama po sebi uzrok spontanih pobačaja, već su podudarni HLA-antigeni biljezi za određene HLA-vezane recesivne gene ili genske defekte, blisko povezane s HLA-B,-DP,-DR i -DQ antigenima^{4,27-36} koji su u roditelja u heterozigotnom obliku, dok u homozigotnom obliku u ploda mogu uzrokovati smrt.^{18,37} Christiansen i sur. postavljaju hipotezu poligenskog obrasca nasljeđivanja, gdje HLA-vezani geni djeluju s drugim genima izraženim na fetusu ili na trofoblastu.³⁸

Uz razvojne defekte uzrokovane izravno HLA-vezanim genima, fetalna smrt može biti uzrokovana i epistatskim međudjelovanjem između HLA-vezanih semiletalnih recesivnih gena i heterozigotnih letalnih gena na drugim kromosomima. HLA-podudarnost i prisutnost C3 alela za transferin povezana je s učestalim spontanim pobačajima, a ako su prisutna oba biljega zajedno, učestalost je pobačaja još izraženija.^{19,39} Osim međudjelovanja recesivnih semiletalnih gena, upozoreno je na mogućnost delecije u HLA-regiji, koja uzrokuje gubitak vezanih gena ključnih za normalnu reprodukciju, kontrolu rasta i razvoja te imunosne funkcije.¹⁸

Brojne su i studije koje, nasuprotno iznesenom, upućuju na to da razina podudarnih HLA-antigena nije značajno viša u parova u kojih se javljaju učestali spontani pobačaji.^{32,40-43} Iako negativni, ovi rezultati ne opovrgavaju ulogu koju HLA ima u reprodukciji jer je moguće postojanje neotkrivenih gena povezanih s HLA-regijom. Oprečne rezultate i neslaganja teško je uskladiti zbog metodoloških razlika istraživanja i potencijalne heterogenosti između subjekata.³⁰ Uz to, vrlo je vjerovatno da više od jedne HLA-regije utječe na reproduktivni ishod i da geni koji utječu na fertilnost nisu isključivo HLA-geni već nepoznati geni u neravnoteži vezanosti (od engl. linkage disequilibrium) s HLA-B i HLA-DR genima.⁴⁴ Stoga fenomen neravnoteže vezanosti u cijeloj HLA-regiji dodatno otežava zaključnu interpretaciju uloge roditeljske HLA-podudarnosti kao vjerodostojnog čimbenika genske predispozicije učestalim spontanim pobačajima.

Uloga citokina u trudnoći

Imunologija trudnoće u zadnjih je desetak godina snažno obilježena Th-1/Th-2 obrascem citokina, koje stvaraju dvije različite vrste zrelih izvršnih CD4⁺ limfocita T. Promjene u trudnoći uključuju posebno imunoregulatorno okruženje u decidui u kojem citokini, čimbenici rasta, steroidni hormoni te prostaglandini, potiskuju proliferaciju limfocita T, stvaranje Th-1 obrasca citokina i izražaj T staničnog receptora, istodobno potičući zaštitni Th-2 citokinski odgovor.⁴⁵ No koncept normalne trudnoće kao *Th-2 fenomen* mora se razmatrati kao djelomično zastarjeo i zasigurno prekomjerno pojednostavljeno,⁴⁶ s obzirom na nužnost ekspresije Th-1 citokina IFN-gama i IL-1 na implantacijskom mjestu tijekom normalne trudnoće.^{17,47} Stoga je potrebna revizija klasičnih postavki uloge Th-1/Th-2 citokinskih obrazaca tijekom različitih razdoblja trudnoće u čovjeka i miša.⁴⁶⁻⁴⁸

Složenost definiranja citokinske mreže u cijelosti uključuje spoznaju da pojedini citokini mogu stvarati suprotne učinke, što ovisi o dozi i tempiranju njihova sudjelovanja u imunosnom odgovoru na fetoplacentnoj površini. Navedeno može biti posljedica genske varijabilnosti, opisane u poglavlju o polimorfizmima gena kao čimbenicima predispozicije za učestale spontane pobačaje. Pokazano je da bi se individualne varijacije visokog, srednjeg i niskog citokinskog odgovora mogle predvidjeti prema genotipu citokina.⁴⁹ Kako su genski polimorfizmi u promotorskim regijama određenih citokina povezani s njihovim izražajem, jasno je da i lučenje citokina može biti određeno na transkripcijskoj razini.⁵⁰

GENETIČKE ABNORMALNOSTI KAO UZROK UČESTALIH SPONTANIH POBAČAJA

Kromosomske abnormalnosti

Kod pojedinačnih spontanih pobačaja, unutar prvih 28 dana trudnoće, kromosomske abnormalnosti javljaju se u visokom postotku (25–62%).^{16,51,52} Najučestaliji kromosomski uzroci spontanih pobačaja su trisomije kromosoma 13, 14, 15, 16, 18, 21 i 22, slijede poliploidije i monosomija X, dok je za razliku od učestalih spontanih pobačaja udio strukturnih kromosomskih abnormalnosti najmanji.^{51,53-56}

I u 4% parova s učestalim spontanim pobačajima, nasuprot 0,2% u normalnoj populaciji, kromosomske abnormalnosti roditelja glavni su genetički uzrok.^{1,15,57} Treba upozoriti da postoji znatna razlika u vrsti kromosomskih abnormalnosti kao uzroku učestalih spontanih pobačaja u odnosu na spontane pobačaje koji se ne ponavljaju.

Balansirane strukturne aberacije roditeljskih kromosoma, uključujući translokacije i inverzije, glavni su kromosomski razlog učestalih spontanih pobačaja. One

moгу uzrokovati nebalansirane strukturne promjene kromosoma u ploda te stoga postoji medicinska indikacija za citogenetičku analizu partnera s učestalim spontanim pobačajima (3 i više uzastopnih prekida trudnoće, s istim partnerom, prije 23. tjedna gestacije).

Iako se smatra da brojčane kromosomske abnormalnosti ne pridonose značajno genetičkoj etiologiji učestalih spontanih pobačaja, treba upozoriti na moguću ulogu gonadnog mozaicizma u roditelja kao uzročnog čimbenika. Prisutnost brojčanih kromosomskih abnormalnosti u stanicama spolnih žlijezda roditelja utječe na stvaranje nebalansiranih kariotipova u ploda. Takav mozaicizam ne nalazimo rutinski budući da rutinska kariotipizacija uključuje stanice mezodermnog podrijetla (limfociti periferne krvi).

Genske abnormalnosti

Iako su provedena brojna istraživanja kako bi se identificirali čimbenici koji bi mogli uzrokovati učestale spontane pobačaje, vrlo se malo zna o genskim mehanizmima.⁵⁸

Kod potencijalnih gena koji utječu na fiziološki tijek trudnoće, moguće su dvije vrste promjena koje mogu potaknuti pobačaj, uključujući monogenske nasljedne bolesti – mutacije gena koje “sve ili ništa”-učinkom kvalitativno mijenjaju fiziološke mehanizme, kao i gensku varijabilnost u obliku genskih polimorfizama, koji na iste mehanizme utječe kvantitativno.

Monogenske nasljedne bolesti

Nekolicina je monogenskih nasljednih bolesti i klinički prepoznatljivih sindroma uz koje se javljaju učestali spontani pobačaji. Mutacije gena odgovorne za spomenute sindrome, odgovorne su i za učestale neuspješne trudnoće. Zna se za četiri sindroma koji se nasljeđuju dominantno, vezano uz X-kromosom i kod kojih tijekom trudnoće dolazi do smrti muških plodova: inkontinencija pigmenti (mutacija na lokusu Xq28),⁵⁹ OFD (orofacijalnodigitalni) sindrom 1 (mutacija na lokusu Xp22.3-p22.2),⁶⁰ fokalna dermalna hipoplazija (mutacija na lokusu Xp22.31) i Aicardijev sindrom (ageneza korpus kalozuma s korioretinalnom abnormalnošću; mutacija na lokusu Xp22).⁵⁹ Franchi i sur. pokazali su da su u nasljednoj trombofiliji (mutacija na lokusu 20p11.2), mutacije gena THBD i EPCR bile češće u žena s neobjašnjenim prekidima trudnoće nakon 20. tjedna gestacije.⁶¹

Uz to, postoje ohrabrujući rezultati koji upućuju na moguće gene čije bi varijacije u obliku polimorfizama mogle biti čimbenicima predispozicije učestalih spontanih pobačaja, uključujući gene povezane s imunosnim sustavom, vaskularizacijom, apoptozom i dr.

Polimorfizam gena kao čimbenik predispozicije za učestale spontane pobačaje

Budući da genski polimorfizmi mogu rezultirati promjenom strukture i funkcije proteinskog proizvoda, značajan dio istraživanja etiologije neobjašnjenih učestalih spontanih pobačaja su studije genske varijabilnosti ključnih molekula u trudnoći, kao mogućih čimbenika predispozicije.

Geni povezani s imunosnim sustavom

Imunosni sustav jedan je od ključnih modulatora trudnoće. Treba upozoriti na moguću važnost genske varijabilnosti brojnih molekula uključenih u taj sustav, kao čimbenika podložnosti učestalim spontanim pobačajima. Genske varijacije u regulaciji ekspresije citokina mogli bi pridonijeti njihovu statusu, kao i posljedičnome moduliranju majčina imunosnog odgovora tijekom trudnoće, posredujući normalnu trudnoću, ali, jednako tako, i njezin prekid. Tako su u žena s neobjašnjenim učestalim prekidima trudnoće pronađeni genski polimorfizmi Th1/Th2 citokina TNF-alfa, IFN-gama, TGF-beta, LIF, IL-1, IL-6 i IL-10.^{50,62-64}

U posljednje vrijeme posebnu pažnju izaziva proupalni citokin IL-18, snažan induktor IFN-gama čija je prisutnost tijekom trudnoće na mjestu implantacije prijeko potrebna.⁶⁵ Čini se da je za implantaciju, održavanje decidue, modifikaciju krvnih žila uterusa i njihovu vazodilataciju te preživljavanje fetoplacentne jedinice, osobito važna regulacija aktivnosti uterinih stanica NK (od engl. Natural Killer), posebice putem IFN-gama, što bi mogao biti glavni posrednik njihove funkcije.¹⁷

Budući da smo se tijekom proteklih godina intenzivno bavili lokalizacijom i razinom izražavanja IL-18 na fetoplacentnoj površini u miša,⁶⁵⁻⁶⁶ nastavili smo istraživanje polimorfizama gena za IL-12/IL-18 u žena s normalnim trudnoćama, u odnosu na žene s učestalim spontanim pobačajima. Kako IL-12 potiče ekspresiju receptora za IL-18 na limfocitima T i B, kao i makrofazima koji snažno produciraju IFN-gama kao odgovor na IL-18,⁶⁷ razina ekspresije i mogući polimorfizam gena za IL-12/IL-18 tijekom trudnoće mogu pridonijeti razumijevanju odnosa na fetoplacentnoj jedinici, posebice tijekom implantacije.

Citokinsko okruženje koje omogućava preživljavanje ploda, posredno je određeno jedinstvenom ekspresijom nekласičnih HLA-antigena klase I na stanicama trofoblasta.^{21,22} Iako paradoksalno, majčino prepoznavanje fetalnih aloantigena podrijetlom od oca dovodi do preusmjerenja neprikladna imunosnog odgovora staničnog tipa na prikladan humoralnog tipa, na čemu se i temelji hipoteza imunotrofizma.⁶⁸

S obzirom na iznimnu važnost HLA-G gena u normalnoj trudnoći, u zadnje su vrijeme provedena brojna

istraživanja veze HLA-G alelnih varijacija i učestalih spontanih pobačaja.²⁸ Aldrich i sur. upozorili su na povećanu učestalost HLA-G*0104 ili HLA-G*0105N alela, istražujući HLA-G polimorfizme u 113 parova s neobjašnjenim učestalim spontanim pobačajima,⁶⁹ dok su Pfeiffer i sur. pokazali značajno povećanje učestalosti HLA-G alela *01013 ili *0105N u žena s učestalim spontanim pobačajima u usporedbi s kontrolnom skupinom.⁷⁰

Geni povezani s koagulacijom i vaskularizacijom

Uspješna implantacija posljedica je međudjelovanja receptivnog endometrija, s jedne, i invazivnog trofoblasta, s druge strane. Vrlo rano tijekom trudnoće stanice endovaskularnog citotrofoblasta ranog zametka napadaju majčine spiralne arterije i zamjenjuju endogeni endotel krvnih žila, sve do razine njihova spoja s velikim krvnim žilama uterusa. Endovaskularni citotrofoblast također napada sloj glatkih mišića krvnih žila, zamjenjujući dijelom kontraktilno glatko mišićno tkivo. Poradi toga majka ne može smanjiti sadržaj hranjivih tvari u krvi, koji dopijeva u placentu bez smanjivanja opskrbe za vlastita tkiva.

Stoga je istraživanje polimorfizama gena, uključenih u modulaciju invazivnosti, vaskularizacije i koagulacije na fetoplacentnoj jedinici, iznimno važan prilog genskoj etiologiji neobjašnjenih učestalih spontanih pobačaja. Nekoliko je studija u zadnje vrijeme uputilo na takvu povezanost, uključujući polimorfizme gena za koagulacijski čimbenik V (Leiden),⁷¹⁻⁷³ inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI1),⁷⁴ protrombin,^{71,73,75} koagulacijski čimbenik XIII⁷⁴ te apolipoprotein E.⁷⁶

Kako venska tromboza na fetoplacentnoj jedinici može biti etiološki čimbenik pobačaja,⁷⁷ posebice je zanimljivo istraživanje mutacija koagulacijskog čimbenika V. Točkasta mutacija G1691A gena za čimbenik V naziva se *Leiden*-mutacija, prema gradu u kojem je otkrivena. Zna se da heterozigoti za *Leiden*-mutaciju imaju 5 do 10 puta veći rizik, a homozigoti čak do 95 puta veći rizik za duboke venske tromboze.

Rey i sur. upozorili su na povezanost polimorfizama određenih gena u nasljedne trombofilije, hiperkoagulacijskog poremećaja koji potiče trombozu i učestalih spontanih pobačaja.¹² To uključuje mutacije gena za koagulacijski čimbenik V, metilentetrahidrofolat reduktazu (MTHFR) i protrombin G20210A (PTm), kao i deficijenciju proteina C, proteina S i antitrombina.

Gubitak fetusa u žena s trombofilijom mogao bi se objasniti snažnom trombozom u krvnim žilama placente, placentalnim infarktom i sekundarnom uteroplacentalnom insuficijencijom.⁷⁸ I trombofilija u ploda mogla bi biti upletena u mehanizam prekida trudnoće, potičući stvaranje ugruška na fetalnoj strani placente. Tako su Dizon-Townson i sur., upozorili na povećan postotak

spontanih pobačaja kada je plod bio nositelj *Leiden*-mutacije.⁷⁹

Ostali geni

Osim gena povezanih s imunosnim sustavom, vaskularizacijom i koagulacijom, čiji su polimorfizmi bili najviše istraživani, u zadnje se vrijeme istražuju polimorfizmi gena i drugih molekula u trudnoći zbog mogućnosti da predstavljaju čimbenike predispozicije za učestale spontane pobačaje neobjašnjenog uzroka.

Progesteron je hormon koji je najizraavnije odgovoran za održanje trudnoće. Uz sustavnu funkciju, progesteron ima i važnu lokalnu ulogu. Limfociti koji izražavaju receptor za progesteron, pod djelovanjem progesterona stvaraju PIBF (od engl. Progesterone induced blocking factor), čijim posredstvom progesteron djeluje kao lokalni imunopotiskivački čimbenik na fetoplacentnoj površini, koji smanjuje stanicama posredovan imunosni odgovor i citotoksičnost stanica NK periferne krvi prema embrionalnim fibroblastima.⁸⁰ Schweikert i sur. upućuju na povezanost polimorfizma gena za progesteronski receptor i učestalih spontanih pobačaja.⁸¹ Pronađene su i pozitivne asocijacije učestalih spontanih pobačaja i polimorfizama gena važnih u biotransformaciji molekula,⁸² metaboličkim putevima^{76,83} te biosintezi molekula.⁸⁴

BUDUĆE SMJERNICE

Normalna trudnoća zahtijeva seriju imunosnih, endokrinih, metaboličkih i krvožilnih regulirajućih procesa. Međutim, značenje pojedinih gena uključenih u te procese nije dovoljno određeno. Do sada je upozoreno na više od 40 gena čija je razina ekspresije u žena s učestalim spontanim pobačajima različita u odnosu prema ženama s normalnim trudnoćama. Ipak, prije postavljanja hipoteza o genskoj podložnosti učestalih spontanih pobačaja, potrebno je precizno razlučivanje uzroka u odnosu na posljedice.⁵⁸

Značajan uvid u kompleksnost genske kontrole ranoga embrionalnog razvoja daju životinjski modeli. Recesivni geni koji reguliraju rast, razvoj i reprodukciju, a vezani su uz glavni kompleks tkivne podudarnosti (MHC, od engl. Major Histocompatibility Complex), pronađeni su u miša, štakora i čovjeka.⁸⁵ Moguće je da MHC/HLA-vezani geni ili genske abnormalnosti, koji su u heterozigotnom obliku u roditelja, mogu postati homozigotni kod fetusa i uzrokovati njegov gubitak. Kod miša je najviše istraživani T/t kompleks koji sadrži seriju lokusa, od kojih svaki ima multiple alele čvrsto vezane uz MHC. Učinci tih gena sežu od smrti embrija do razmjerno manjih anomalija kostura, uključujući abnormalnosti reproduktivnog sustava.⁸⁶ *Knock out* eksperimenti kod miša upozorili su na više od 20 gena

čija delecija ima za posljedicu rani prekid trudnoće. Ti geni mogu imati utjecaj i na postnatalni razvoj.

No osim gena koji su uključeni u procese prenatalnog i postnatalnog rasta i razvoja, a čije bi promjene u kvalitativnom i/ili kvantitativnom smislu mogle pridonijeti učestalim spontanim pobačajima, potrebno je upozoriti i na gene koji mogu potaknuti kromosomske nepravilnosti u roditelja, što će, isto tako, rezultirati neuspješnom reprodukcijom. Moguće je postojanje nepoznatih genskih mutacija koje izazivaju nepravilnu konjugaciju, rekombinaciju i/ili nerazdvajanje homolognih kromosoma tijekom prve mejotičke diobe ili nerazdvajanje sestrinskih kromatida tijekom druge, posebice u majke, te na taj način uzrokuju brojčane abnormalnosti kromosoma.⁸⁷ Ako postoje geni koji moduliraju razinu mejotičke rekombinacije kromosoma, moguće je i da njihove mutacije dovode do smanjene ili povećane razine rekombinacije i utječu na preuranjeno razdvajanje homolognih kromosoma te posljedičnu aneuploidiju.

Treba upozoriti i na moguću ulogu genomskog upisa (od engl. genomic imprinting), iznimke Mendelova zakona o jednakoj vrijednosti očevih i majčinih gena. Kako ekspresija nekih gena ovisi o roditeljskom podrijetlu, za normalan razvoj čovjeka apsolutno je nužna prisutnost genoma oba roditelja u zigoti. Stoga bi greška u genomskom upisu pojedinih molekula važnih u trudnoći, poput HLA-G, H19 i IGF-II, mogla pridonijeti genskoj etiologiji spontanih pobačaja.

Brojna istraživanja mehanizama trudnoće nisu dala jasne smjernice koje bi pomogle praktičarima kao dijagnostičko ili terapijsko sredstvo u rješavanju problema učestalih spontanih pobačaja nepoznate etiologije. Naš doprinos sustavnom istraživanju uloge genskih čimbenika u etiologiji učestalih spontanih pobačaja, razvijat ćemo kroz projekt HuMGeN (Human Miscarriage Genetic Network) koji smo pokrenuli na međunarodnoj razini. Cilj je tog projekta skupljanje relevantnoga kliničkog materijala i testiranje gena kandidata asocijacijskim studijama. Sva buduća istraživanja provodit ćemo na istim uzorcima, a rezultate pojedinih studija uklopiti u zajednički mozaik koji nam može pomoći u razumijevanju učestalih spontanih pobačaja nepoznate etiologije u čovjeka.

LITERATURA

- Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E, Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Human Reproduction Update* 2002; 8:463-81.
- Clifford K, Rai R, Regan L. Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage. *Hum Reprod* 1997; 12:387-9.
- McIntyre JA, McConnachie PR, Taylor CG, Faulk WP. Clinical, immunologic and genetic definitions of primary and secondary recurrent spontaneous abortions. *Fertil Steril* 1984; 42:849-55.
- Gill TJ 3rd. Genetic factors in fetal losses. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987; 15:133-7.
- Bricker L, Farquharson RG. Types of pregnancy loss in recurrent miscarriage: implications for research and clinical practice. *Human Reproduction* 2002; 17:1345-50.
- Giles RW. Recurrent abortion caused by *Haemophilus influenzae* with subsequent successful pregnancy. *J Obstet Gynecol* 2003; 23:87.
- Hill JA. Immunological mechanisms of pregnancy maintenance and failure: A critique of theories and therapy. *AJRI* 1990; 22:33-41.
- Kutteh WH, Rote NS, Silver R. Antiphospholipid antibodies and reproduction: The anti phospholipid antibody syndrome. *AJRI* 1999; 41:133-52.
- Roberts CP, Murphy AA. Endocrinopathies associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2000; 18:357-62.
- Rai R, Backos M, Rushworth F, Regan L. Polycystic ovaries and recurrent miscarriage-a reappraisal. *Hum Reprod* 2000; 15:612-15.
- Bussen S, Sutterlin M, Steck T. Endocrine abnormalities during the follicular phase in women with recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 1999; 14:18-20.
- Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 2003; 361:901-8.
- Coumans ABC, Huijgens PC, Jakobs C, Schats R, de Vries JJP, van Pampus MG i sur. Haemostatic and metabolic abnormalities in women with unexplained recurrent abortion. *Hum Reprod* 1999; 14:211-14.
- Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 2000; 320:1708-12.
- Gill TJ III. Reproductive immunology; a personal view. *AJRI* 1992; 27:87-8.
- Smith A, Bannatyne P, Russel P, Elwood D, Den Dulk G. Cytogenetic studies in perinatal death. *Aus N Zealand J Obstet Gynaecol* 1990; 30:206-10.
- Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med* 2000; 192:259-70.
- Gill TJ 3rd. Role of the major histocompatibility complex region in reproduction, cancer, and autoimmunity. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35:211-5.
- Ho HN, Gill TJ III, Hsieh CY, Yang YS, Lee TY. The prevalence of recurrent spontaneous abortions, cancer, and congenital anomalies in the families of couples with recurrent spontaneous abortions or gestational trophoblastic tumors. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:461-6.
- Fernandez N, Cooper J, Sprinks M, Abdelrahman M, Fiszler D, Kurpisz M i sur. A critical review of the role of the major histocompatibility complex in fertilization, preimplantation development and feto-maternal interactions. *Hum Reprod Update* 1999; 5:234-48.

21. Hutter H, Hammer A, Dohr G, Hunt JS. HLA expression at the maternal-fetal interface. *Dev Immunol* 1998; 6:197-204.
22. Le Bouteiller P. The role of HLA-G expression in the embryo during implantation. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2004; 33:S9-12.
23. Le Bouteiller P, Sargent IL. HLA class I molecules in the placenta: which ones, where and what for? A workshop report. *Placenta* 2000; 21:93-6.
24. Hammer A, Hutter H, Dohr G. HLA Class I Expression on the Materno-fetal interface. *AJRI* 1997; 38:150-8.
25. Ober C, Hyslop T, Elias S, Weitkamp LR, Hauck WW. Human leukocyte antigen matching and fetal loss: results of a 10-year prospective study. *Hum Reprod* 1998; 13:33-8.
26. Thomas MJ, Harger JH, Wagener DK, Rabin BS, Gill III TJ. HLA-sharing and spontaneous abortion in humans. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 151:1053-8.
27. Kruse C, Steffensen R, Varming K, Christiansen OB. A study of HLA-DR and -DQ alleles in 588 patients and 562 controls confirms that HLA-DRB1*03 is associated with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2004; 19:1215-21.
28. Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, Gray HL i sur. Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am J Hum Genet* 2003; 72:1425-35.
29. Takakuwa K, Adachi H, Hataya I, Ishii K, Tamura M, Tanaka K. Molecular genetic studies of HLA-DRB1 alleles in patients with unexplained recurrent abortion in the Japanese population. *Hum Reprod* 2003; 18:728-33.
30. Christiansen OB, Ring M, Rosgaard A, Grunnet N, Gluud C. Association between HLA-DR1 and -DR3 antigens and unexplained repeated miscarriage. *Hum Reprod Update* 1999; 5:249-55.
31. Takakuwa K, Hataya I, Arakawa M, Kikuchi A, Higashino M, Yasuda M i sur. Possible susceptibility of the HLA-DPB1*0402 and HLA-DPB1*04 alleles to unexplained recurrent abortion: analysis by means of polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism method. *Am J Reprod Immunol* 1999; 42:233-9.
32. Sbracia M, Mastrone M, Scarpellini F, Grasso JA. Influence of histocompatibility antigens in recurrent spontaneous abortion couples and on their reproductive performances. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35:85-92.
33. Jin K, Ho HN, Speed TP, Gill TJ III. Reproductive failure and the major histocompatibility complex. *Am J Hum Genet* 1995; 56:1456-67.
34. Ober C, Steck T, van der Ven K, Billstrand C, Messer L, Kwak J i sur. MHC class II compatibility in aborted fetuses and term infants of couples with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* 1993; 25:195-207.
35. Gill TJ III. Invited Editorial: Influence of MHC and MHC-linked genes in reproduction. *Am J Hum Genet* 1992; 50:1-5.
36. Ho HN, Gill TJ 3rd, Nsieh RP, Hsieh HJ, Lee TY. Sharing of human leukocyte antigens in primary and secondary recurrent spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163:178-88.
37. Gill TJ 3rd. Genetic factors in reproduction and their evolutionary significance. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37:7-16.
38. Christiansen OB, Pedersen B, Mathiesen O, Husth M, Grunnet N. Maternal HLA class II alleles predispose to pregnancy losses in Danish women with recurrent spontaneous abortions and their female relatives. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35:239-44.
39. Gill TJ 3rd. Mechanisms of action of major-histocompatibility-complex-linked genes affecting reproduction. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41:23-33.
40. Souza SS, Ferriani RA, Santos CM, Voltarelli JC. Immunological evaluation of patients with recurrent abortion. *J Reprod Immunol* 2002; 56:111-21.
41. Wagenknecht DR, Green KM, McIntyre JA. Analyses of HLA-DQ alleles in recurrent spontaneous abortion (RSA) couples. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37:1-6.
42. Dizon-Townson D, Nelson L, Scott JR, Branch DW, Ward K. Human leukocyte antigen DQ alpha sharing is not increased in couples with recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34:209-12.
43. Eroglu G, Betz G, Torregano C. Impact of histocompatibility antigens on pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:1364-9.
44. Ober C. Current topic: HLA and reproduction: lessons from studies in the Hutterites. *Placenta* 1995; 16:569-77.
45. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunology Today* 1993; 14:353-6.
46. Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. Reproductive immunology 2003: reassessing the Th1/Th2 paradigm? *Immunology Letters* 2004; 92:207-14.
47. Croy BA, Chantakru S, Esadeg S, Ashkar AA, Wei Q. Decidual natural killer cells: key regulators of placental development. *J Reprod Immunol* 2002; 57:151-68.
48. Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. TH1 /TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134:93-119.
49. Hutchinson IV, Pravica V, Hajeer A, Sinnott PJ. Identification of high and low responders to allografts. *Rev Immunogenetics* 1999; 1:323-33.
50. Reid JG, Simpson NAB, Walker RG, Economidou O, Shillito J, Gouli HC i sur. The carriage of the pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss. *AJRI* 2001; 45:35-40.
51. Rushdia ZY, Naeem R. Cytogenetic abnormalities in products of conception: a relationship revisited. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52:88-96.
52. Eiben B, Bartels I, Bahr-Porsh S, Borgmann S, Gatz G, Gellert G i sur. Cytogenesis analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet* 1990; 47:656-63.
53. Duzcan F, Atmaca M, Cetin GO, Bagci H. Cytogenetic studies in patients with reproductive failure. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82:53-6.

54. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case - control study. *Hum Reprod* 2002; 17:446-51.
55. Badovinac AR, Buretić-Tomljanović A, Starčević N, Kapović M, Vlastelić I, Randić L. Chromosome studies in patients with defective reproductive success. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44:279-83.
56. Brajenović-Milić B, Petrović O, Krašević M, Ristić S, Kapović M. Chromosomal anomalies in abnormal human pregnancies. *Fetal Diagn Ther* 1998; 13:187-91.
57. Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J i sur. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Human Reproduction* 2003; 18:182-8.
58. Baek KH. Aberrant gene expression associated with recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod*. 2004; 10:291-7.
59. Wettke-Schafer R, Kantner G. X-linked dominant inherited diseases with lethality in hemizygous males. *Hum Genet* 1983; 64:1-23.
60. Ferrante MI, Giorgio G, Feather SA, Bulfone A, Wright V, Ghiani M i sur. Identification of the gene for oral-facial-digital type I syndrome. *Am J Hum Genet* 2001; 68:569-76.
61. Franchi F, Biguzzi E, Cetin I, Facchetti F, Radaelli T, Bozzo M i sur. Mutations in the thrombomodulin and endothelial protein C receptor genes in women with late fetal loss. *Br J Haematol* 2001; 114:641-6.
62. Prigoshin N, Tambutti M, Larriba J, Gogorza S, Testa R. Cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss of unknown cause. *AJRI* 2004; 52:36-41.
63. Daher S, Shulzhenko N, Morgun A, Mattar R, Rampim GF, Camano L i sur. Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2003; 58:69-77.
64. Babbage SJ, Arkwright PD, Vince GS, Perrey C, Pravica V, Quenby S i sur. Cytokine promoter gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2001; 51:21-7.
65. Ostojić S, Dubanchet S, Chaouat G, Abdelkarim M, Truysens C, Capron F. Demonstration of the presence of IL-16, IL-17 and IL-18 at the murine fetomaternal interface during murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49:101-12.
66. Chaouat G, Zourbas S, Ostojić S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N i sur. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *Journal of Reproductive Immunology* 2002; 53:241-56.
67. Ahn HJ, Maruo S, Tomura M, Mu J, Hamaoka T, Nakanishi K i sur. A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducing factor in enhanced production of IFN-gamma. *J Immunol* 1997; 159:2125-31.
68. Wegmann TG. Fetal protection against abortion: is it immunosuppression or immunostimulation? *Ann Immunol* 1984; 135:309-12.
69. Aldrich CL, Stephenson MD, Karrison T, Odem RR, Branch DW, Scott JR i sur. HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:1167-72.
70. Pfeiffer KA, Fimmers R, Engels G, van der Ven H, van der Ven K. The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:373-8.
71. Finan RR, Tamim H, Ameen G, Sharida HE, Rashid M, Almawi, WY. Prevalence of factor V G1691A (factor V-Leiden) and prothrombin G20210A gene mutations in a recurrent miscarriage population. *Am J Hematol* 2002; 71:300-5.
72. Wramsby ML, Sten-Linder M, Bremme K. Primary habitual abortions are associated with high frequency of factor V Leiden mutation. *Fertil Steril* 2000; 74:987-91.
73. Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, Karas GB, Karavida A, Agorastos T i sur. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 2000; 15:458-62.
74. Dossenbach-Glaninger A, van Trotsenburg M, Dossenbach M, Oberkanins C, Moritz A, Krugluger W i sur. Plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G polymorphism and coagulation factor XIII Val34Leu polymorphism: impaired fibrinolysis and early pregnancy loss. *Clin Chem* 2003; 49:1081-6.
75. Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, Rubsamen H, Rogenhofer N, Hasbargen U i sur. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol* 2001; 46:124-31.
76. Zetterberg H, Palmer M, Ricksten A, Poirier J, Palmqvist L, Rymo L i sur. Influence of the apolipoprotein E epsilon4 allele on human embryonic development. *Neurosci Lett* 2002; 324:189-92.
77. Kupfermanc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A i sur. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999; 340:9-13.
78. Arias F, Romero R, Joist H, Kraus FT. Thrombophilia: a mechanism of disease in women with adverse pregnancy outcome and thrombotic lesions in the placenta. *J Matern Fetal Med* 1998; 7:277-86.
79. Dizon-Townson DS, Meline L, Nelson LM, Varner M, Ward K. Fetal carriers of the factor V Leiden mutation are prone to miscarriage and placental infarction. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177:402-05.
80. Szekeres-Bartho J, Varga P, Kinsky R, Chaouat G. Progesterone-mediated immunosuppression and the maintenance of pregnancy. *Res Immunol* 1990; 141:175-81.
81. Schweikert A, Rau T, Berkholz A, Allera A, Daufeldt S, Wildt L. Association of progesterone receptor polymorphism with recurrent abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 113:67-72.
82. Sata F, Yamada H, Kondo T, Gong Y, Tozaki S, Kobashi G i sur. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 2003; 9:165-9.
83. Zetterberg H, Regland B, Palmer M, Rymo L, Zafiroopoulos A, Arvanitis DA i sur. The transcobalamin codon 259 polymorphism influences the risk of human spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2002; 17:3033-6.

84. Sata F, Yamada H, Yamada A, Kato EH, Kataoka S, Saijo Y i sur. A polymorphism in the CYP17 gene relates to the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9:725-8.
85. Lokki ML, Laitinen T. Role of major histocompatibility complex class III genes in recurrent spontaneous abortions. *Front Biosci* 2001; 6:23-9.
86. Gill TJ 3rd, Siew S, Kunz HW. Major histocompatibility complex (MHC)-linked genes affecting development. *J Exp Zool* 1983; 228:325-45.
87. Hixon M, Millie E, Judis LA, Sherman S, Allran K, Taft L i sur. FISH studies of the sperm of fathers of paternally derived cases of trisomy 21: no evidence for an increase in aneuploidy. *Hum Genet* 1998; 103:654-7.